

聚合酶链反应分析仪计量测试技术探讨

杨智

(沈阳市市场监管事务服务中心(沈阳市检验检测中心) 沈阳计量测试院 辽宁 沈阳 110179)

[摘要] 聚合酶链式反应分析仪(PCR仪)广泛应用于生命科学研究、临床检验、食品检测、司法鉴定等领域。PCR仪器计量特性直接关系到检测结果,在新冠肺炎疫情期间得到了非常广泛的应用。为了确保PCR仪器检测结果是可采信的,同时是符合相关实验室认证要求的,本文就市场上常见的几种PCR仪器的主要计量特性参数、检测方法、检测设备及标准物质等方面进行了讨论,以其为PCR仪器的计量检定工作提供参考和依据。

[关键词] PCR仪; 计量测试; 标准物质

[DOI] 10.12252/j.issn.2096-6261.2021.04.2163

一、引言

聚合酶链式反应分析仪作为核酸检测的重要仪器,广泛应用于生命科学、生物医学等诸多领域,尤其在新冠肺炎疫情期间,更是作为核酸检测的重要设备得到了非常广泛的应用。然而,对测量结果准确性的验证和测量结果的可追溯性仍处于起步阶段。如何保证仪器的性能符合要求,让实验结果有据可查,业界目前还没有给予足够的重视,测量溯源工作还没有像其他的检测手段那样普及。对于分子生物学领域的高精度仪器来说,这些都是尤为重要的关键点。生物实验的特殊性和复杂性容易导致结果重现性和稳定性差等问题,如果仪器本身的测量特性存在偏差,将直接影响反应过程,进而对结果的准确性产生很大影响。同时,PCR仪器测量测试是生物识别的重要组成部分。其行业统一标准的制定可以更好地服务核酸检测相关行业,具有巨大的市场和潜在的经济效益。

二、热循环仪温度测量

温控模块是各类热循环仪的通用部件,其温度准确性、温度检测的均匀性直接影响DNA扩增检测过程的最终结果。应该说,温度是PCR仪器最重要的测量特性之一。由于PCR是扩增的几何级数,任何细微的温度变化都可能使得实验结果严重偏离设计精度,甚至可能导致产生错误的扩增结果,从而导致假阳性或假阴性。热循环仪常见的加热模块有多种不同的孔数,其中96孔最为常见。目前常见的PCR校准标准主要定义了精密温度传感器和数据采集分析模块的数量,一般意义上需要不少于15个由精密温度传感器和数据采集分析模块组成的温度传感模块,才能有效地保障温度检测结果的准确可靠。

PCR温度校准装置需要满足探头靠近加热孔的要求,传感器精度足够高,响应速度快,并且可以在PCR盖关闭的情况下延长数据传输线。稳定的温度循环是定制精密设备所必需的。PCR仪器温度的测量和测试技术指标主要有温度精度、模块温度均匀性、升温下降率、温度持续时间精度等。其中温度精度是起到决定性作用的指标。温度均匀性是指热循环仪温控模块上不同区域温度极值的大小。一般来说,PCR仪器的温控模块具有边缘效应,即环境温度与中心温度略有不同。做的相对较好厂家可达 $\pm 0.3^{\circ}\text{C}$ 。升温和降温的速度影响扩增效率,这关系到PCR仪器再短时间内复制出的产物的能力的强弱。厂家规定的升温速率为 $\pm 3^{\circ}\text{C}/\text{s}$,但是这个参数收到传感器的精度影响较大,在反复使用多次以后,可能出现衰减的现象。温度超调是指温度在从一个设定值向着另一个设定值变化的过程中,超出设定值的现象。过高的过冲温度也不利于测试,可能对试验结果带来负面影响,严重时甚至可能破坏实验结果的准确性。一般在目标温度的5%以内是可以接受的,越低越好,保温时间精度是指热循环仪设置的保温时间与实际保温时间之间的相对偏差。PCR仪器的标准要求控制在5%以内。

三、PCR仪器荧光测量

热循环仪的荧光测量主要针对荧光定量热循环仪,一般分为温度控制系统和荧光检测系统两部分。实时荧光PCR技术是在PCR反应体系中加入荧光基团,通过荧光信号的积累实时监测整个PCR扩增过程,最后通过标准曲线等对未知样品进行定量分析。一般采用荧光化学检测方法,分为荧光探针法或荧光染料法。对于其荧光系统的测量和检测,目前有染料法和光学

系统校准法。染料法主要利用FAM、ROX等荧光染料配制不同浓度标准荧光染料溶液,加入定量PCR仪的检测孔中,运行PCR程序,通过仪器的荧光系统通道数据采集目标,检测荧光强度的精度。同时,用已知浓度的标准荧光染料进行梯度稀释后,可将荧光测量结果与标准溶液浓度进行线性回归,得到荧光线性相关结果。在进行荧光测量参数测试时,需要注意:1)选择可溯源的荧光染料纯度标准物质;2)注意荧光染料的稳定性和储存条件,避免因荧光染料自身的属性变化影响测试结果;3)稀释和加样过程中使用称重天平设备,需要由专业人员操作,避免人工操作造成实验误差。使用化学试剂方法检测荧光系统时,存在试剂制备过程中人为操作影响较大等问题。使用物理方法测试荧光系统可以避免此类问题。

四、热循环仪样品测量

影响PCR实验结果的因素包括诸多方面。样品可以控制的因素是标准物质,通过选择准确稳定的标准物质,并从可靠的厂家中选择特异性好、活性稳定的试剂来保证高质量的扩增。尽可能选择具有相关专业素养的人员操作仪器,避免误操作和不熟练操作,减少测量结果的人为误差。与普通PCR相比,定量PCR的定量性能主要体现在定量线性范围和仪器分辨率上。目标DNA的定量分析在临床基因诊断、DNA鉴定和基因改造检测中尤为重要。仪器的定量性能也直接决定了测量结果的准确性。

五、结束语

总体而言,我国在聚合酶链反应分析仪测定检测技术方面的研究有待提高。PCR仪的广泛应用为广大科研技术人员提供了方便,但其基本性能和工作状态需要定期测量,以保证实验数据的可靠性。本文根据相关标准和校准规范讨论了几种不同类型热循环仪的测量和测试技术,并提出了一些存在的问题和值得注意的点。一般来说,温度性能测试和温度校准装置的研究和应用比较多,操作比较简单,对技术人员的专业要求不高,配套的数据处理分析软件比较成熟,温度标准制作国内外基本可以满足测量需要。荧光和样品测量需要具有生物相关专业背景的人员才能操作。可用的标准材料种类不同,受人员操作和环境因素影响较大。对于如何进一步提高PCR仪器的实验结果的可信性的研究工作还有待后续的进一步研究。本文为PCR仪器的测量检测技术、标准仪器和标准材料的选择提供了参考和依据,对促进PCR技术的发展和也将起到积极的推动作用。

参考文献

- [1]魏群,吕丹,陈海凌.聚合酶链式反应分析仪(PCR仪)校准装置的研究与设计[J].质量技术监督研究,2019(5).
- [2]程远霞,魏燕,刘宝林,等.PCR(聚合酶链式反应)仪温度特性的实验研究与分析[J].仪表技术与传感器,2009,01(1):31-31.
- [3]余松林.聚合酶链式反应分析仪温度校准装置的研制[J].纳税,2017,000(029):185-185.
- [4]冉姝,周国燕,王景宇,等.聚合酶链式反应(PCR)量热学的实验研究[C]//中国工程热物理学会传热传质学学术会议.2008.